海産二枚貝におけるリゾチームの存在と特性^{*1}

高橋 計介, 森 勝義, 野村 正

(1985 年 9 月 26 日受理)

Occurrence and Characterization of Lysozyme in the Marine Bivalves

Keisuke Takahashi,^{*2} Katsuyoshi Mori,^{**} and Tadashi Nomura^{**4}

Occurrence and partial characterization of lysozymes in the oyster *Crassostrea gigas*, and the mussel *Mytilus edulis*, were investigated. Lysozymes were fractionated on a chitin-coated cellulose column. The lysozyme activities were measured using both *Micrococcus lysodeikticus* and glycol chitin as substrates. In the oyster, high lysozyme activity was observed in the extracts of the digestive diverticula. Lower activities were detectable in the extracts of the gill, mantle, crystalline style, and in the hemolymph, though no activities were found in the adductor muscle. Similar results were obtained in the mussel. The oyster lysozyme activity was maximal at pH 5.5 and 50°C, whereas the mussel one was maximal at pH 5.5 and 60°C. The enzyme activities were inhibited mainly by Fe³⁺ and iodine, whereas they were enhanced slightly by Ca²⁺ and Na⁺. Finally, a possible relationship between lysozyme and bactericidin was discussed.

リゾチーム (Lysozyme: EC 3.2.1.17.) は動植物界に広く分布する溶菌酵素として知られているが、下等動物における生理的意義については十分明らかにされていない。

無脊椎動物の体液性防御因子については、種々の抗菌性因子の存在が報告されているが、その中には、主体がリゾチームではないかと考えられているもの¹⁻³⁾とリゾチームとは全く別の因子であると考えられているもの⁴⁻⁷⁾とがある。

マガキ *Crassostrea gigas* においても、殺菌素の存在が明らかにされている⁸⁾が、その主体が如何なる成分よりなるものか、また、どのような作用により抗菌性を示すのか等についてはほとんど明らかにされていない。

そこで、本研究ではリゾチーム活性を測定することによって、殺菌素とリゾチームとの関係を明らかにする手がかりを得ることを目的とし、加えてムラサキガイ *Mytilus edulis* のリゾチーム活性を測定し、本酵素の二、三の性質について検討を行なった。

実験方法

実験材料 供試貝類のうち、マガキは宮城県牡鹿半島沿岸で垂下養殖された採苗後約 2 年の成員 (平均殻高

10 cm) を用いた。

また、ムラサキガイは宮城県牡鹿半島沿岸から天然のもの (平均軟体部重量 2.6 g) を採取し、直ちに実験に供するか、あるいは、水温 12~15°C の循環水槽中で保存し、順次実験に供した。

試料の調製 Fig. 1 に実験法の概略を示した。マガキ組織液、血リンパ (囲心腔液より採取)、ムラサキガイ組織液を調製し、測定用試料液とした。すなわち、各組織を 1.5~5.0 g の範囲で摘出し、1 M NaCl を含む Sørensen リン酸緩衝液 (pH 8.0) を 15 ml 加えて 3~5 分間ホモジナイズした後、12,000×g, 4°C で 10 分間遠心分離して得た上清を測定用試料液とした。

アフィニティークロマトグラフィー 望月、松宮^{9,10)}の方法に従い、アフィニティークロマトグラフィーを行なった。すなわち、Imoto and Yagishita¹¹⁾の方法に従って調製したキチンコーテッドセルロース (以下 CC セルロース) に試料液を加え、冷所で攪拌混合し、リゾチームを吸着させた後、これを濾過し CC セルロース分を集め、カラム (1.6×11 cm) に充填した。1 M NaCl を含む Sørensen リン酸緩衝液 (pH 8.0) で洗浄した後、0.1 M 酢酸で溶出操作を行なった。溶出液はフラクシヨソコレクター (Atto 製) によって 4 ml ずつ分取し、

^{*1} 昭和 59 年日本水産学会東北支部大会 (仙台) において発表。

^{*2} 現住所: 群馬県水産試験場 (Present address; Gunma Prefectural Fisheries Experimental Station, Maebashi 371, Japan).

^{**3} 現住所: 水産庁養殖研究所 (Present address; National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-01, Japan).

^{**4} 東北大学農学部 (Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 980, Japan).

Fig. 1. Scheme of measurement of lysozyme activity.

1 N NaOH を加えて pH を中性付近に調整した後, 280 nm における吸光度からリゾチーム活性を測定した。

Fig. 2 にムラサキガイリゾチームの溶出曲線を示した。

活性測定法 溶出液のリゾチーム活性の測定には, 望月, 松宮^{9,10)}と同様に 2 種類の方法を用いた。すなわち, *Micrococcus lysodeikticus* の乾燥菌体 (Sigma 製) を基質とする Smolelis and Hartsell¹²⁾ の方法とグリコールキチン (Sigma 製) を基質とする Imoto and Yagishita¹³⁾ の方法である。それぞれの方法について標品の卵白リゾチーム (Sigma 製) を用いて, 標準曲線を作成した (Figs. 3, 4)。マガキ, ムラサキガイの各試料液はいずれも至適 pH に調整してから活性測定を行なった。

Fig. 3. Standard curve for the measurement of lysozyme activity by the method of Smolelis and Hartsell¹²⁾ using hen's egg-white lysozyme as standard.

Fig. 4. Standard curve for the measurement of lysozyme activity by the method of Imoto and Yagishita¹³⁾ using hen's egg-white lysozyme as standard.

リゾチーム活性に対する pH と温度の影響 マガキ, ムラサキガイ, および卵白のリゾチームについて検討を行なった。いずれも *M. lysodeikticus* の乾燥菌体を基質として, 活性の測定を行なった。pH の影響をみる実験では, 試料液 1 ml に対し, pH 3.0~8.0 (pH 0.5 間隔, 計 11 測定点) の各 pH 値に調整した McIlvaine 緩衝液 0.5 ml を加え, *M. lysodeikticus* の菌体懸濁液

Fig. 2. Chromatography on a chitin-coated cellulose column. Crude extract of the mussel whole soft body (10 ml) was mixed with chitin-coated cellulose (16 ml) at 4°C for 30 min. Then the mixture was poured into a column (1.6 × 11 cm) and washed with Sørensen phosphate buffer (pH 8.0) containing 1 M NaCl at a flow rate of 1.3 ml/min. From the column, lysozyme was eluted by 0.1 M acetic acid, and 4 ml-fractions were collected. All fractions were monitored both for absorbance at 280 nm (—) and for lysozyme activity (▨) using *M. lysodeikticus* as substrate. The change of eluent is indicated by the arrow.

3 ml と混合し、37°C で 15 分間インキュベートして各 pH 値におけるリゾチーム活性を測定した。また、温度の影響をみる実験では、試料液 1 ml に対し、各リゾチームの至適 pH に調整した McIlvaine 緩衝液 0.5 ml を加えた後、20~80°C (10°C 間隔、計 7 測定点) において pH の実験のときと同様の方法でリゾチーム活性を測定した。

金属イオンおよび阻害剤等の影響 金属イオンの存在や阻害剤などがリゾチーム活性に及ぼす影響について、マガキ、ムラサキガイ、および卵白について検討した。金属イオンの影響をみる実験では、10 種類のイオンについて *M. lysodeikticus* を基質として測定を行なった。イオン強度は一定とし (0.012)、試料の抽出及び洗浄には 0.1 M グリシン緩衝液を用いた。カラム溶出液は脱塩水に対し、セルロースチューブを用いて透析した。活性の測定は試料液 1 ml に対し各イオン溶液 0.5 ml を加え、pH のときと同様に行なった。また、EDTA や酸化剤としてのヨウ素、リゾチームの活性阻害剤とされる *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) など 6 種類の物質 (Table 4) のリゾチーム活性に及ぼす影響についても実験を行なった。

結 果

リゾチーム活性の存在 2 種類の活性測定法によるマガキリゾチームの活性値と *M. lysodeikticus* の乾燥菌体を基質として測定したムラサキガイリゾチームの測定値を Table 1 と 2 に示した。マガキでは、鰓、外套膜、消化盲囊、閉殻筋、晶体の各部位と血リンパについ

Table 1. Lysozyme activity in oyster

Sample		Lysozyme activity ($\mu\text{g/g}$ wet wt.) (Range)	
		<i>M. lysodeikticus</i>	Glycol chitin
Oyster	Gill	0.39 [6] (0.26–0.76)	7.51 [3] (6.97–8.36)
	Mantle	0.88 [6] (0.51–1.28)	2.49 [3] (2.41–2.66)
	Digestive diverticula	4.26 [6] (3.91–5.31)	34.4 [3] (27.5–41.7)
	Adductor muscle	N.D. [4]	N.D. [3]
	Crystalline style	4.16 [6] (0–12.3)	1.28 [3] (0–4.86)
	Hemolymph	0.47 $\mu\text{g/ml}$ [4] (0–0.90)	1.36 $\mu\text{g/ml}$ [3] (0–1.55)

Lysozyme activity was measured by the methods of Smolelis and Hartsell¹²⁾ and Imoto and Yagishita¹³⁾ using *M. lysodeikticus* and glycol chitin as substrate, respectively. Number of oysters is presented in square brackets. N.D.; not detected.

Table 2. Lysozyme activity in mussel

Sample		Lysozyme activity (Range)
		<i>M. lysodeikticus</i>
Mussel	Gill	1.82 [4] (0.42–2.70)
	Mantle	3.13 [4] (1.89–4.21)
	Digestive diverticula	6.91 [4] (4.26–7.98)
	Crystalline style	3.64 [6] (0–11.2)

Lysozyme activity was measured by the method of Smolelis and Hartsell¹²⁾ using *M. lysodeikticus* as substrate. Lysozyme activity was expressed as $\mu\text{g/g}$ wet weight. Number of mussels is presented in square brackets.

て測定を行なったところ、2 種類の手法とも消化盲囊で活性が最も高く、グリコールキチンを基質とした測定で 34.4 $\mu\text{g/g}$ wet wt. という値を示した。鰓、外套膜、晶体、血リンパでも活性が検出されたが、閉殻筋では活性が見られなかった。

ムラサキガイでは、鰓、外套膜、消化盲囊、晶体の 4 部位について測定したが、活性は消化盲囊で最も高い値を示し、マガキに比べ全体的に活性が高かった。

リゾチーム活性に対する pH と温度の影響 リゾチーム活性に及ぼす pH の影響をみると、マガキ、ムラサキガイのリゾチーム活性は共に pH 5.5 で、卵白リゾチームは pH 6.5~7.0 で最高活性を示した。マガキとムラサキガイのリゾチームは、pH 4.0 以下および pH 7.0 以上では活性がかなり低下し、特にマガキリゾチームは、pH 7.0 以上では失活した (Fig. 5)。

Fig. 5. Activities of oyster (■—■), mussel (●—●), and hen's egg-white (▲—▲) lysozymes as a function of pH. Lysozymes were obtained from the chitin-coated cellulose column. Then, lysozyme activities at various pH (3.0–8.0) were measured with McIlvaine buffer using *M. lysodeikticus* as substrate.

Fig. 6. Activities of oyster (■—■), mussel (●—●), and hen's egg-white (▲—▲) lysozymes as a function of temperature. Lysozymes were obtained from the chitin-coated cellulose column. Then, lysozyme activities at various temperatures (20°–80°C) were measured using *M. lysodeikticus* as substrate.

温度の影響については、マガキリゾチームは50°Cで、ムラサキガイおよび卵白リゾチームは60°Cで最高活性を示し、特にムラサキガイリゾチームは70°C以上の高温でもかなりの活性を保持することがわかった (Fig. 6)。

金属イオンおよび阻害剤等の影響 各種金属イオンの影響を調べた結果、鉄イオン、特に Fe^{3+} で強い阻害が、また、 Zn^{2+} でもやや阻害の傾向がみられた。一方、 Ca^{2+} 、 Na^{+} などではやや活性化が認められた (Table 3)。

また、阻害剤等の試験では酸化剤であるヨウ素で顕著な阻害がみられ、EDTAでも弱い阻害が認められたが、GlcNAcなどその他の物質ではあまり影響がなかった (Table 4)。

Table 3. Effects of metal ions on lysozyme activities of oyster, mussel, and hens' egg-white

Metal ions	Conc. (mm)	Relative activity (%)		
		Oyster	Mussel	H.E.L.*
None	—	100	100	100
NaCl	12	105	100	102
KCl	12	100	100	106
CaCl_2	4	105	104	109
MgCl_2	4	105	100	102
ZnCl_2	4	100	86	95
CoCl_2	4	100	96	93
FeCl_2	4	86	93	86
FeCl_3	2	81	60	72
LaCl_3	2	nd*	nd	84
CdCl_3	2	nd	nd	84

Lysozyme activities were measured using *M. lysodeikticus* as substrate.

Ionic strength, $I=0.012$, constant.

*1 Hen's egg-white lysozyme.

*2 Not determined.

Table 4. Effects of various compounds on lysozyme activities of oyster, mussel, and hen's egg-white

Compounds	Conc. (mm)	Relative activity (%)		
		Oyster	Mussel	H.E.L.*
None	—	100	100	100
EDTA	1	85	86	96
Sodium citrate	1	100	93	90
Iodine	1	50	29	56
Imidazole	1	100	86	100
L-Histidine	1	100	100	100
N-acetyl-D-glucosamine	1	100	93	96

Lysozyme activities were measured using *M. lysodeikticus* as substrate.

* Hen's egg-white lysozyme.

考 察

アフィニティークロマトグラフィーによるリゾチームの分離、精製にはリガンドを異にするいくつかの方法があるが、試料の種類による特異性の違いや手法の複雑さの点などでどの方法が最適であるとは言えない面がある。また、活性測定法に関しても、Jollès and Jollès が最近の総説¹⁴⁾で触れているように、簡易で精度の高い方法を確立しようとする多くの努力にもかかわらず、依然として *M. lysodeikticus* を基質とする方法が広く用いられている。そこで本研究では、望月、松宮の研究^{9,10)} 同様、キチンをリガンドとする CC セルロースカラムクロマトグラフィーによるリゾチームの分離の後、基質を異にする2種類の方法でリゾチーム活性の測定を行ない、加えて二、三の性質について検討した。

本実験では、マガキ、ムラサキガイとも消化盲囊で最も活性が高い点で一致した (Tables 1, 2)。活性が消化盲囊で高いことはムラサキガイでは指摘されている。¹⁵⁾ ムラサキガイでは組織により低い活性を示したものもあるが、マガキに比べ全体的に高い活性を示している。マガキでは組織による差が大きく、2種類の方法で活性の高い部位が異なっている。このように、2種類のリゾチーム活性測定法で得られた結果の間には必ずしも一定の関係が見られなかった。その理由として、以前から指摘されているように、基質特異性の問題¹⁰⁾やグリコールキチンに対するキチナーゼの影響¹⁶⁾が考えられるほか、2つの方法の原理の違いも影響していると思われる。また、同様の測定方法を用いた望月、松宮の報告¹⁰⁾は、今回の結果に比べ著しく高い活性を検出し、ふれも大きい。この違いは、実験条件や材料等による差とも考えられるが、今後更に検討する必要がある。

リゾチーム活性に及ぼす pH の影響について、今回の

実験結果では、マガキ、ムラサキガイのリゾチームはともに pH 5.5、卵白リゾチームは pH 6.5~7.0 で最高活性を示した。卵白リゾチームの至適 pH については従来より中性付近であるとされ、¹⁷⁾ 他の報告^{10,13)}の結果とはほぼ一致した。

マガキ、ムラサキガイの至適 pH について、他の海産貝類などと比較してみると、アメリカガキでは pH 5.5、¹⁸⁾ オオノガイでは pH 5.0¹⁹⁾ と近い値を示し、また、頭足類のオオベソオウムガイでは pH 5.5²⁰⁾ という値であるが、ムラサキガイにおいて、その至適 pH が 6.4 であるという報告¹⁵⁾もあり、更に精査の必要があると考えられる (Fig. 5)。

至適温度については、マガキリゾチームは 50°C、ムラサキガイおよび卵白リゾチームは 60°C であった。ムラサキガイリゾチームが高温でも比較的高い活性を保持していたのに対し、マガキリゾチームは高温ではかなり活性が低下した。他の貝類における温度の影響、熱安定性の報告^{10,19)}でも、リゾチームは高温でもかなりの活性を保持するとされている。これに対して、マガキリゾチームでは高温に弱い傾向がある (Fig. 6)。

金属イオンおよび数種の化合物の影響では、鉄イオン、特に Fe^{3+} で阻害がみられた点でマシジミリゾチームでの報告¹⁰⁾と同様の傾向を示した。また、 Zn^{2+} の影響に関しては、卵白リゾチームにおいて活性化¹⁰⁾と阻害²¹⁾という両方の報告があるが、本研究ではムラサキガイおよび卵白リゾチームはやや阻害の傾向を示した。一方、 Ca^{2+} 、 Na^+ などで微弱な活性化がみられた。また、活性に特定のイオンを必要とはしないようである (Table 3)。

試験した6種の阻害剤等の物質のうち、酸化剤としてのヨウ素以外の物質では大きな効果はなかった (Table 4)。卵白リゾチームに関する研究では、イミダゾール、ヒスチジンの阻害効果が報告されている²²⁾が、それは今回の実験濃度 (1 mm) よりもかなり高い濃度 (0.08 M~0.4 M) での実験であり、低濃度では効果が認められないものと考えられる。同様のことが、GlcNAc にもあてはまる。本研究ではある一定のイオン強度および濃度の範囲での活性への影響を調べたにすぎないので、より詳細な性質についての検討を行なう必要がある。

次に、リゾチームと殺菌素との関係について若干考察する。無脊椎動物において抗菌性因子である殺菌素は、単一物質とは考えにくい、その主体はリゾチームである可能性が大きいと言われている。^{23,24)} 環形動物においては少なくとも2成分を持つ抗菌性因子の存在^{3,9)}や、リゾチーム^{1,3)}あるいはリゾチームとは異なる因子^{8,9,25)}の存在が報告されている。Jollès and Jollès もその総説¹⁴⁾の中で、無脊椎動物におけるリゾチームは、免疫グ

ロブリンを産生できないこれらの生物の生体防御的な役割を担っているであろうと述べている。以上のようなことから、強い溶菌作用を引き起こすリゾチームが、生体防御機構に関与している可能性は充分考えられる。

森ら⁸⁾は、マガキ自然殺菌素に対して同様の高い感受性を示した2種の細菌、*M. luteus* (*lysodeikticus*) と *Arthrobacter* sp. HS 29 strain を用いて殺菌素価を測定している。その結果をみると、殺菌素活性は消化盲囊部 (胃および晶体を含む) で著しく高く、外套膜、鰓でも検出されたが、閉殻筋では確認されなかった。この結果と今回の実験結果 (Table 1) とを比較すると、活性の高い部位や閉殻筋で活性がみられない点などで一致している。しかし、特性の点などでは違いもあり、本研究の段階でははっきりしたことは言えないが、マガキにリゾチーム活性が確認されたことで、リゾチームが殺菌素の重要成分の1つである可能性はあると思われる。

海産二枚貝でのリゾチームの役割をバクテリアに対する防御と考えている報告はいくつか見られる。^{2,26,27)} しかし、アメリカガキにおいて、McDade and Tripp^{27,28)} は高いリゾチーム活性を外套膜と血リンパのみから検出しており、今回の結果とは組織部位が異なっている。また、McHenery ら¹⁵⁾はリゾチームの役割を腸内細菌相に対する制御であるとし、防御は二次的なものとして考えている。従って、リゾチームと抗菌性因子とのかわりについては、これら因子の生理的機能を明らかにするような方向で、さらに詳細な検討が必要であると思われる。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金によって行われたので、記して謝意を表します。

文 献

- 1) J.-P. Perin and P. Jollès: *Biochim. Biophys. Acta*, **263**, 683-689 (1972).
- 2) S. Y. Feng: *Contemp. Topics Immunobiol.*, **4**, 225-231 (1974).
- 3) A. Çotuk and R. P. Dales: *Comp. Biochem. Physiol.*, **78A**, 469-474 (1984).
- 4) E. E. Evans, B. Painter, M. L. Evans, P. Weinheimer, and R. T. Acton: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **128**, 394-398 (1968).
- 5) R. S. Anderson and B. M. Chain: *J. Invertebr. Pathol.*, **40**, 320-326 (1982).
- 6) P. Roch, P. Valembois, N. Davant, and M. Lassegues: *Comp. Biochem. Physiol.*, **69B**, 829-836 (1981).
- 7) H. Kamiya, K. Muramoto, and K. Ogata: *Experientia*, **40**, 947-949 (1984).
- 8) 森 勝義, 五日市 周三, 村山 克夫, 野村 正: 日水誌, **46**, 1385-1389 (1980).

- 9) 望月 篤, 松宮政弘: 日水誌, **47**, 1065-1068 (1981).
- 10) 望月 篤, 松宮政弘: 日水誌, **49**, 131-135 (1983).
- 11) T. Imoto and K. Yagishita: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 465-470 (1973).
- 12) A. N. Smolelis and S. E. Hartsell: *J. Bacteriol.*, **58**, 731-736 (1949).
- 13) T. Imoto and K. Yagishita: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1154-1156 (1971).
- 14) P. Jollès and J. Jollès: *Mol. Cell. Biochem.*, **63**, 165-189 (1984).
- 15) J. G. McHenry, T. H. Birkbeck, and J. A. Allen: *Comp. Biochem. Physiol.*, **63B**, 25-28 (1979).
- 16) R. Fänge, G. Lundblad, and J. Lind: *Mar. Biol.*, **36**, 277-282 (1976).
- 17) 林 勝哉, 井本泰治: リゾチーム, 化学の領域選書, **9**, 南江堂, 東京, 1974, pp. 14-17.
- 18) G. E. Rodrick and T. C. Cheng: *J. Invertebr. Pathol.*, **24**, 41-48 (1974).
- 19) T. C. Cheng and G. E. Rodrick: *Biol. Bull.*, **147**, 311-320 (1974).
- 20) 望月 篤, 松宮政弘, 三上 進: 日水誌, **47**, 1223-1225 (1981).
- 21) F. Ostroy, R. A. Gams, J. D. Glickson, and R. E. Lenkinski: *Biochim. Biophys. Acta*, **527**, 56-62 (1978).
- 22) M. Shinitzky, E. Katchalski, V. Grisaro, and N. Sharon: *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 332-343 (1966).
- 23) 花岡正男: 比較生物学 (山村雄一, 江上信雄, 西塚泰美監編), 代謝, Vol. **14**, 臨時増刊号, 中山書店, 東京, 1977, pp. 597-608.
- 24) 森 勝義: 化学と生物, **17**, 267-274 (1979).
- 25) B. M. Chain and R. S. Anderson: *Biol. Bull.*, **164**, 41-49 (1983).
- 26) S. W. Hardy, T. C. Fletcher, and L. M. Gerrie: *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 473-475 (1976).
- 27) J. E. McDade and M. R. Tripp: *J. Invertebr. Pathol.*, **9**, 531-535 (1967).
- 28) J. E. McDade and M. R. Tripp: *J. Invertebr. Pathol.*, **9**, 581-582 (1967).